

**A központi idegrendszeri *amylin* leírása és potenciális szerepe  
rágcsálók utódgondozó magatartásában**

Doktori tézis

**Borsicsné Szabó Éva Rebeka**

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



**Témavezető:** Dr. Dobolyi Árpád, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

**Hivatalos bírálók:** Dr. Köves Katalin, az MTA doktora, ny.egyetemi tanár

Dr. Hrabovszky Erik, az MTA doktora, tudományos tanácsadó

**Szigorlati bizottság elnöke:** Dr. Halász Béla, az MTA doktora, egyetemi tanár

**Szigorlati bizottság tagjai:** Dr. Lukáts Ákos, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Dénes Ádám, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest

2016

## I. BEVEZETÉS

Az amylin, vagy szigetsejt-amyloid polipeptid (IAPP) egy 37 aminosavból álló peptid, a kalcitonin peptidcsalád tagja. Az amylin, és annak pancreasból az inzulinnal együtt történő felszabadulását 1986-ban fedezték fel. Az eddig legtöbbet vizsgált funkciója az étkezés leállítása a vércukorszint emelkedésének hatására. Pramlintide elnevezésű analógját kiterjedten alkalmazzák 1-es és 2-es típusú cukorbetegség inzulinnal történő kezelésének kiegészítőjeként. A glükóanyagcserében játszott szerepe mellett az energia metabolizmusra és az obezitásra gyakorolt hatását vizsgáló klinikai tanulmányok kimutatták, hogy az amylin agonistával való kezelés elősegíti a súlycsökkentést is. Az amylin további hormonális funkcióit bizonyították a kardiovaszkuláris rendszerrel és a csontanyagcserével kapcsolatos szabályozásokban. A perifériás amylin anorexigén hatásait elsődlegesen a circumventrikuláris szerveken át az agyba jutva fejt ki. Mindazonáltal az amylin G-proteinhez kapcsolt „B” családjába tartozó receptorát a központi idegrendszer több olyan területén is leírták, amelyek a circumventrikuláris szerveken át a perifériáról érkező amylin számára valószínűleg nem hozzáférhetők. Az amylin központi idegrendszeri expresszióját csupán néhány évvel ezelőtt kutatócsoportunk mutatta ki laktáló patkány anyák preopticus területén. Az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek preopticus területen belüli elhelyezkedését, valamint az expresszió körülményeit tekintve a periférián megjelenő amylintól eltérően a központi idegrendszeri amylin funkciója az anyai adaptációk szabályozásában lehet.

A preopticus area (POA) nevét a látópálya kereszteződéséhez való viszonya alapján kapta, a chiasma opticum-tól craniálisan található terület. Reprodukciós magatartásokban játszott potenciális szerepére elsőként, patkányok esetén, egyik magjának nemek közti méretbeli különbsége hívta fel a figyelmet. A leírt különbséget később humán mintákon is igazolták: fiatal férfiak preopticus területének egy bizonyos része kétszer akkora kiterjedésű, és ott mintegy kétszer annyi sejt található, mint nők esetén. Ezt a magot a preopticus area szexuálisan dimorf magjának (SDN-POA) nevezték el. A régió további sokrétű, különféle szabályozási mechanizmusokban betöltött szerepét tükrözi az itt expresszálódó neuropeptidek, receptorok és neuromodulátor anyagok sokfélesége. A preopticus terület részt vesz a szexuális magatartás szabályozásában, a szülői viselkedés kialakulásának és fenntartásának regulációjában, emlősökben a területén található gonadotropin felszabadító hormon (GnRH) révén a gonadális tengely szabályozásában, ezen felül a termoregulációban, az alvás-ébrenlét szabályozásában, a só- és vízháztartás, valamint a vizeletürítés szabályozásában.

A preopticus régióval szoros topográfiai és funkcionális kapcsolatban álló nucleus interstitialis striae terminalis (BNST) a hypothalamus, a septum és az amygdala találkozásánál, a striatumtól mediálisan található. Szerepet játszik a szexuális magatartás kialakulásában, egyik magcsoportja, az SDN-POA-hoz hasonlóan, szintén szexuálisan dimorf. További funkciói közé tartozik a hímek egymással szembeni agressziójának, valamint a szorongás és a stresszre adott válaszreakciók, illetve a preopticus területtel való összeköttetése révén az anyai magatartás szabályozása.

Anyai viselkedés alatt az anyák azon, jellegzetes viselkedési elemeinek összességét értjük, mely az utódok felnevelését szolgálja, így alapvető szereppel bír a faj fenntartásában. Kialakulását veleszületett és tanult elemek határozzák meg. Intenzív kutatásának létjogosultságát támasztják alá humán vonatkozásai: a szülést követő hangulati zavarok, súlyos esetben a postpartum depresszió megjelenése, mely nem csak az anyák, hanem általuk az utódok fizikai és lelki jóllétét is veszélybe sodorja. Kifejeződésében és szabályozásában mind endokrin, mind neuronális tényezők szerepet játszanak. Bár az anyai viselkedés alapját a neuroendokrin rendszer képezi, szabályozását, megjelenését és fenntartását külső ingerek (kölykök felől érkező szaglási, szenzoros, tapintási információk), különböző hormonok, neurokémiai mediátorok és specifikus agyterületek összehangolt munkája egészíti ki. Az anyai viselkedés kialakulásának körülményeiben (hormonális, szenzoros hatások) és jellemzőiben számos hasonlóságot lehet felfedezni humán és nem humán fajok között. Az anyai viselkedés tanulmányozásának története patkányok esetén több évtizedre nyúlik vissza, jelenleg ez a faj az anyai viselkedés vizsgálata szempontjából leggyakrabban alkalmazott modellszervezet, ugyanakkor a genetikailag módosított egértörzsek megjelenésével egyre több, az egerek anyai viselkedését vizsgáló tanulmány születik. Az anyai viselkedés a peripartum időszakra jellemző hormonális indukció mellett, az állatok kölyköknek való expozíciójával is elérhető. Ezt a folyamatot szenzitizációnak nevezik, melynek eredményeként a szenzitizálódott állatoknál az anyákra jellemző viselkedési mintázathoz nagyon hasonló magatartásformák jelennek meg. Az anyai magatartást vizsgáló számos teszt közül az anyai motiváció mérésére a kondicionált helypreferencia teszt (conditioned place preference test, CPP), míg az anyákban bekövetkező emocionális változások leírására a kényszeres úszás teszt (forced swimming test, FST) alkalmas.

## **II. CÉLKITŰZÉSEK**

### **1. A szülést követően milyen időbeli lefolyással és eloszlásban jelenik meg az amylin patkányokban és egerekben?**

- A. Változik-e az amylin mRNS szintje a szülés körüli (peripartum) és a szülés utáni (postpartum) időszakban patkányok központi idegrendszerében?
- B. Kimutatható-e az amylin indukciója egér anyák hypothalamusában?
- C. Megjelenik-e az amylin, mint funkcionális peptid, anya patkányok preopticus területén?
- D. Változik-e a perifériás amylin immunreaktivitása a szülést követően?

### **2. A szülésen kívül milyen más hatások idézhetik elő az amylin központi idegrendszeri indukcióját?**

- A. Befolyásolja-e az ovariectomia, illetve az azt követő anyai viselkedést kiváltó szenzitizálás az amylin megjelenését nullipara nőstények preopticus területen?
- B. Hogyan változik a központi idegrendszeri amylin mRNS-mennyisége az anyai viselkedésre való szenzitizálás és az éheztetés hatására?
- C. Kimutatható-e a funkcionális amylin peptid a szenzitizálást követően a preopticus területen?

### **3. Mutatnak-e anyai aktivációt a preopticus területen található amylin expresszáló idegsejtek?**

- A. Mutatnak-e Fos-aktivációt az amylin-immunreaktív idegsejtek kölykök hatására?
- B. Aktiválódnak-e az amylin mRNS-t kifejező neuronok kölykök visszaadásának hatására?

### **4. Kapcsolatban állnak-e az amylin expresszáló idegsejtek a tuberoinfundibuláris peptid 39 (TIP39) - kettes típusú parathormon receptor (PTH2R) neuromodulátor rendszerrel?**

- A. Milyen elhelyezkedés jellemzi az amylin-ir neuronokat és a TIP39-rostokat a preopticus területen?
- B. Milyen az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek és a PTH2R-ir neuronok elhelyezkedése a preopticus területen?
- C. Befolyásolja-e PTH2R hiánya az amylin mRNS-szintjét?

**5. Hogyan befolyásolja a szülés és az anyai viselkedésre való szenzitizálás az egerek anyai motivációját és depresszió-szerű viselkedését?**

A. Megváltozik-e az anyai motiváció szülést, illetve szenzitizálást követően ?

B. Befolyásolja-e a szülés és az anyai viselkedésre való szenzitizálás az egerek kényszeres úszás tesztben mért aktivációját, azaz depresszió-szerű viselkedését?

**6. Milyen hatással van az amylin hiánya az anyák, illetve a szenzitizált szűz nőstények viselkedésére?**

A. Van-e szignifikáns eltérés a vad típusú és az amylin-hiányos egér anyák kondicionált helypreferenciájában?

B. Megváltozik-e amylin hiányában az egér anyák kényszeres úszás tesztben mért viselkedése?

### III. MÓDSZEREK

Az állatkísérletek tervezése és kivitelezése az European Communities Council 2010. szeptember 22-ei direktívája (2010/63/EU), a Semmelweis Egyetem Egyetemi Állatkísérleti Bizottságának Állatvédelmi Szabályzata és az ÁNTSZ 3453/003/2009. számú engedélye szerint történt.

A vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetében végeztük.

A szülést követően patkányokban és egerekben bekövetkező amylin-indukció időbeli lefolyásának és eloszlásának meghatározásához *in situ* hibridizációs hisztokémiát alkalmaztunk. Az amylin peptid preopticus területen belüli megjelenését, illetve hasnyálmirigyen belüli jelenlétét immunhisztokémiával mutattuk ki.

Az ovariectomia, az anyai viselkedésre való szenzitizálás, valamint az éheztetés amylin-indukcióra és amylin-immunreaktivitásra gyakorolt hatásának vizsgálatát amylin *in situ* hibridizációval, valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR), valamint immunhisztokémiával végeztük.

Az amylin-tartalmú idegsejtek anyai aktivációjának meghatározása Fos- és amylin kettős immunhisztokémiával, valamint amylin *in situ* hibridizációs hisztokémia és Fos-immunhisztokémia kombinálásával történt.

Az amylin-neuronok és a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer topográfiai és funkcionális kapcsolatának feltérképezését amylin-TIP39 kettős immunhisztokémiával, X-Gal hisztokémiával, továbbá az amylin-mRNS szintjének PTH2R hiányában bekövetkező meghatározását amylin *in situ* hibridizációs hisztokémiával végeztük.

A szülés és a szenzitizálás viselkedésre kifejtett hatását kondicionált helypreferencia teszt (CPP), valamint kényszeres úszás teszt (FST) során vizsgáltuk.

Az anyai viselkedésre való szenzitizálást szűz nőstényekkel végeztük, patkányok esetén ez 4-8 napon keresztüli folyamatos kölyökjelenlétet, míg egerek esetén 4 napon keresztüli, napi 2-2 órás kölyökexpozíciót jelentett.

## IV. EREDMÉNYEK

### 1. Az amylin-indukció időbeli lefolyása és eloszlása patkányokban és egerekben

Az *in situ* hibridizációs hisztokémia során patkány és egér anyák esetén kimutatott, a szülést megelőző állapothoz képest bekövetkező, emelkedett amylin jel az amylin-szint jelentős mértékű emelkedésére enged következtetni. Eredményeink nem csupán az amylin indukciójára, hanem annak időbeli lefolyására vonatkozóan is szolgáltatnak adatokat. Az amylin mRNS indukciója a szülés előtt 1 nappal (a vemhesség 21. napján) még nem, de az azt követő napon már bekövetkezett, és a postpartum időszak előrehaladtával további emelkedést mutatott. Az amylin immunreaktivitás szintén a szülést követően, és nem azt megelőzően (vemhesség idején) jelent meg. Ez megerősíti az ISH hisztokémiával kimutatott amylin jel specificitását, továbbá ezáltal feltételezhető, hogy az amylin mRNS-szintjének emelkedését a funkcionális peptid megjelenése követi. Az amylin mRNS-t expresszáló idegsejtek és az amylin immunreaktivitást mutató neuronok patkány anyák preopticus területén belüli eloszlása megegyezett. Ennek ismeretében ezeket a sejteket amylin neuronokként definiáltuk. Az amylin neuronok a preopticus area jelentős, de nem minden részén, elszórtan helyezkednek el. Az amylin idegsejtek a nucleus preopticus medialis-ra (MPN), a mediális preopticus mag dorsolaterális területére (MPA), valamint a BNST ventrális részére korlátozódnak, amely területeken az amylin nem tartalmazó idegsejtekkel hasonló arányban fordulnak elő, és azokkal egyenletes eloszlást mutatnak.

Az amylin mRNS-indukciója nem csupán patkány anyák, hanem laktáló egerek esetén is bekövetkezett. Egerek esetén az indukció helye és körülményei a patkányokénál leírtakéval megegyezett: csak a szülést követően, és a központi idegrendszeren belül csak a mediális preopticus terület bizonyos részein (MPN, MPA), valamint a BNST ventrális területén következett be. Patkányok és egerek anyai viselkedését tekintve sok hasonlóság fedezhető fel, így a két modellszervezet homológ területein hasonló körülmények között indukálódó amylin szerepe a két állatcsoport esetén azonos lehet.

A periférián előforduló amylinról ismert, hogy a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben vezikulumokban tárolódik és onnan szabadul fel. Ennek ismeretében valószínűsíthető, hogy a központi idegrendszeri amylin a preopticus terület neuronjaiból szabályozott vezikuláris transzport során ürül. A perifériás amylin az inzulinnal együtt szekretálódik, legjobban ismert funkciója az étkezés leállítása a vércukorszint emelkedésének hatására. Ugyanakkor a hasnyálmirigyben expresszálódó amylin szintjét a kölykök jelenléte

nem befolyásolja, tehát a táplálékfelvétel szabályozásán kívül az anyai viselkedés szabályozásában valószínűleg nem vesz részt, szemben a patkány anyák központi idegrendszerében megjelenő amylinnel, melynek szintje mindaddig magas marad, ameddig az anya állatok kölykeik jelenlétében vannak.

Míg egyes peptidek (prolaktin, oxytocin, vazopresszin) a preopticus területen végződő terminálisokból felszabadulva fejthetik ki hatásukat az anyai viselkedésre, addig más neuropeptidok (opioidek, tachykininek, kortikotropint felszabadító hormon) nem csak a preopticus területen, hanem az agy számos más részén is expresszálódnak. Ezzel szemben az amylin csak a preopticus területre korlátozódó expressziója révén a neuropeptidok között egyedülálló előfordulással rendelkezik.

## **2. Amylin-indukció ovariectomia, anyai viselkedésre való szenzitizálás, illetve éheztetés hatására szűz nőstény patkányok preopticus területén**

Mivel az amylin patkányok és egerek esetén az anyai viselkedés szabályozásában központi szerepet játszó területen egy erőteljes hormonális változásokat jelentő időszakban, a postpartum periódusban jelenik meg, ezért felmerült annak lehetősége, hogy indukciója szteroid hormonok által mediált folyamat. Míg ovariectomia átesett nullipara nőstények esetén amylin mRNS nem volt kimutatható a preopticus területen, az ovariectomiát követő szenzitizálás hatására mégis bekövetkezett az amylin központi idegrendszeri indukciója. Ez tehát az amylin kölykök általi, ugyanakkor szexuálhormonoktól független indukcióját feltételezi. Az ISH hisztokémia által nyert adatokat kvantitatív RT-PCR segítségével validáltuk, amely az anyai viselkedést mutató (szenzitizált) nőstény patkányok esetén az amylin indukcióját megerősítette. Szenzitizált nőstények amylin neuronjainak preopticus területen belüli eloszlása az anya patkányoknál leírtakkal egyezett meg.

A perifériás amylin anorexigén hatásáról és adipozitási szignálként való meghatározásáról szóló irodalmi adatok ismeretében RT-PCR technika alkalmazásával összehasonlítottuk az amylin mRNS mennyiségét éheztetés, valamint kölykök folyamatos jelenléte által szenzitizálódott és anyai viselkedést mutató szűz nőstény patkányok esetén. Az éheztetés az amylin mRNS szintjére hatástalan volt, amihez képest a szenzitizálás eredményeként jelentős mértékű amylin indukció volt megfigyelhető a preopticus területen. Patkány anyák perifériás amylin szintjének vizsgálata során nem találtunk különbséget a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben expresszálódó amylin mennyiségében kölykök jelenlétének vagy azok hiányának függvényében sem. Tehát a központi és perifériás amylin



indukciójának hatásmechanizmusa egymástól eltérő módon valósul meg: a periférián szecernálódó amylin esetén a kölykök jelenléte, illetve azok hiánya nem, csak maga a táplálékfelvétel, illetve az azt követő, hasnyálmirigyben bekövetkező szekréciónak változások, míg a preopticus területen megjelenő amylin esetén a kölykök jelenléte a hormon expressziójának kiváltója.

A szenzitizált állatokban bekövetkezett, RT-PCR technikával kimutatott, központi idegrendszeri amylin-indukciót immunhisztokémiai festés révén is megvizsgáltuk, mely során igazoltuk, hogy a szenzitizálás hatására maga a funkcionális peptid is megjelenik a preopticus területen, továbbá nem csak a kölykök jelenléte, hanem az irányukba mutatott kölyökgondozó magatartás az, ami az amylin indukciójához szükséges, ugyanis a szenzitizálási folyamat ellenére anyai viselkedést nem, hanem a kölykökkel szemben averzív magatartást mutató nullipara nőtényeknél amylin-indukció nem következett be a preopticus területen. A nem szenzitizálódott állatok negatív amylin festése azokkal a kontroll nőtényekével egyezett meg, akik kölykökkel még sosem kerültek kapcsolatba.

Ezen eredményeink az anyai magatartás szabályozásában szerepet játszó preopticus területen, speciális körülmények között (szülés, szenzitizálás) megjelenő amylin anyai viselkedést meghatározó neuropeptidként való definiálását tovább erősítik.

### **3. A preopticus területen lévő amylin-tartalmú idegsejtek anyai aktivációja**

Az amylin neuronok aktivációs vizsgálata során az aktivált sejtekben kifejeződő, korai aktivációs gén termékeként ismert c-fos fehérjét a sejtszintű aktiváció markereként alkalmaztuk. Kísérletünkben az anyák kölyköktől való 22 órás szeparációja az anyai c-fos pozitív neuronok számának jelentős csökkenésével jár. Kölykök visszaadásának hatására több agyterületen jelennek meg c-fos-ir neuronok. A legerősebb Fos-immunpozitivitást mutató agyterületek közé tartozik a preopticus area. A preopticus területen belül c-fos-t expresszáló idegsejtek jelentős mennyisége volt megfigyelhető az MPN, az MPA, valamint a BNST ventrális részén. Ezen kölykök hatására c-fos-t expresszáló idegsejtek megjelenése és preopticus területen belüli eloszlása a korábbi irodalmi adatokkal egyezett meg, mindemellett a kölykökvisszaadás hatására aktiválódó neuronok és az amylin-t expresszáló idegsejtek elhelyezkedése rendkívül hasonló. Ezenfelül c-fos és amylin kettős immunhisztokémia együttes alkalmazásával az is megállapítható volt, hogy az amylin-ir neuronok jelentős része (85,6 %) aktiválódott kölykök visszaadásának hatására. A Fos-pozitivitást mutató amylin-ir neuronok aránya az MPN, az MPA és a BNST ventrális része között jelentős mértékben nem különbözött. Az amylin neuronok kölykök hatására bekövetkező jelentős mértékű aktivációja

amylin *in situ* hibridizációs hisztokémia és c-Fos immunhisztokémia kombinálásával is megerősítést nyert: a kölykök visszaadásának hatására a preopticus területen megjelenő intenzív c-Fos immunreaktivitást csaknem valamennyi amylin mRNS-t expresszáló neuron esetén detektáltunk, ami a patkány anyákban kifejeződő amylin neuronok kölykök jelenlétében bekövetkező magas szintű aktivitására utal.

A kölykök visszaadásának hatására aktiválódó mediális preopticus mag és az azt körülvevő területek az agy számos területére vetülnek, többek között a laterális septum, a BNST, a substantia innominata, az amygdala, illetve a hypothalamus számos (periparaventricularis zóna, ventromediális mag, nucleus arcuatus, laterális hypothalamicus mag, periaqueductalis szürkeállomány) területére. Feltételezhető, hogy a projekciók egy része révén a preopticus területen előforduló amylin a projekciók célterületein található amylin receptorokon keresztül fejt ki hatását. Így az amylin és saját receptora egy peptid neuromodulátor rendszert alkotva befolyásolhatja az anyai viselkedést.

Az, hogy a kölyköktől származó ingerek közül mely, vagy melyek felelősek az amylin neuronok aktivációjáért, egyelőre nem ismert. A kölyköktől származó, az amylin neuronok aktivációjában elsődlegesen szerepet játszó stimulus az anyai adaptációk fő hajtóerejeként ismert szoptatás, illetve a szoptatás jelentette visceroszenzoros inger lehet. A szopási inger jelentette aktiváció érkezik a thalamus posterior intralaminaris komplexében található TIP39 neuronok felől, melyek a szopási információ átkapcsoló állomásaként, a mediális hypothalamicus területekre való projekciójuk révén részt vesznek a szopás hatására bekövetkező prolaktin felszabadulásban. Mivel a thalamus ezen területe a preopticus terület egyik neuronális bemenetét jelenti; így az amylin neuronok aktivációja a szopási információt közvetítő posterior thalamicus TIP39 idegsejtek révén is megvalósulhat.

#### **4. Az amylin-neuronok és a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer topográfiai és funkcionális kapcsolata**

A mediális preopticus area egyik, pályajelölési technikával kimutatott, jelentős bemenetét a thalamus posterior intralaminaris komplexében (PIL) található TIP39 neuronok adják. A TIP39 neuronok a preopticus területtel való kapcsolatuk révén az anyai motiváció szabályozásában vesznek részt. A TIP39 indukcióját, központi idegrendszeri megjelenésének körülményeit tekintve az amylinhez nagyon hasonló: csak a postpartum időszakban a központi idegrendszer bizonyos területein jelenik meg, továbbá kölykök visszaadásának hatására Fos-, azaz anyai aktivációt mutat. A TIP39 a kettes típusú parathormon receptor

(PTH2R) endogén liganduma. Nemcsak a TIP39-sejtek preopticus areával való közvetlen kapcsolatát, hanem a PTH2R ezen a területen belüli megjelenését is leírták.

Az amylin-ir neuronok és a PIL-eredetű TIP39-rostok anatómiai kapcsolatának vizsgálatára amylin-TIP39 kettős immunhisztokémiai festést végeztünk patkány anyák preopticus területén. Az amylin-ir neuronok és a TIP39-rostok preopticus területen belüli elhelyezkedése nagyon hasonló: TIP39-rostok legnagyobb számban az MPN, az MPA, illetve a BNST ventrális részén helyezkednek el, akárcsak az amylint kifejező idegsejtek, továbbá a TIP39-rostok terminálisai az amylin-ir neuronokhoz rendkívüli közelségben végződnek.

Az amylin TIP39-PTH2R rendszerrel való kapcsolatát tovább erősíti az a tény, hogy egér anyák preopticus területén az *in situ* hibridizációs hisztokémia segítségével kimutatott amylin mRNS-t expresszáló, valamint az immunhisztokémiai festés révén amylin-immunreaktivitást mutató sejtek eloszlása rendkívül hasonló a PTH2R területen belüli megjelenésével. A TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer és amylin funkcionális kapcsolatát sejteti, hogy kettes típusú parathormon receptor hiányában laktáló egér anyákban az amylin mRNS szintje a vad típusú állatokéhoz képest szignifikáns csökkenést mutatott. Mivel a TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszer szerepet játszik a szopás-által indukált anyai motiváció szabályozásában, így az amylinnel való kapcsolata révén ez az anyai magatartásra kifejtett TIP39-hatás az amylin neuronok beidegzése révén valósulhat meg.

## **5. A szülés és a szenzitizálás viselkedésre kifejtett hatása egerekben**

Az anyákban endokrin és emocionális adaptációs folyamatok játszódnak le, melyek rövid idő alatt megteremtik az utódokról való gondoskodás feltételeit. A szülést követő változások viselkedésbeli változásokkal járnak együtt.

Az anyai magatartást vizsgáló teszteket (kondicionált helypreferencia teszt, kényszeres úszás teszt) kontroll (szűz) nőstény egerek, laktáló anya állatok, szenzitizált nőstények és az ösztrozs ciklus hatásának kizárására petefészekirtott nőstényekkel is elvégeztük.

Az anyai motivációt vizsgáló CPP kísérletünkben a kísérleti állatoknak egy kölyök-asszociált és egy semleges, specifikus kondicionált stimulushoz nem köthető környezet között kellett választania. Az egér anyák szignifikánsan több időt töltöttek a kölyök-asszociált dobozban, mint a kontroll nőstények, ezenfelül az egér anyák a kölyök-asszociált dobozban szignifikánsan több időt töltöttek, mint a kontroll dobozban. Mindemellett a kontroll nőstények esetén egy tendencia volt megfigyelhető: több időt töltöttek a kontroll dobozban, mint a kölyök-asszociált dobozban. A petefészekirtott nőstények kondicionált helypreferencia tesztben mutatott viselkedése a kontroll nőstényekéhez volt hasonló, ez alapján

valószínűsíthető, hogy az anyai motiváció inkább a kölykök érzékelésétől, mintsem a petefészekhormonok jelenlététől függ. A szenzitizált nőtények a kölyök-asszociált dobozban szignifikánsan több időt töltöttek, mint a kontroll dobozban, továbbá a szenzitizált nőtények kölyök-asszociált dobozban töltött ideje a laktáló anyaállatokétól nem különbözött. Tehát a szenzitizált nőtényekben kialakult preferencia mértéke hasonló volt az anya egerek esetén tapasztalt preferenciához, ami azt feltételezi, hogy az anyai motiváció szenzitizált nullipara egerekben a laktáló anya egerekhez hasonló módon emelkedett meg.

A postpartum periódusban a rágszáló anyák másik jellemző tulajdonsága a csökkent mértékű szorongás. Az anyaság depresszió-szerű viselkedésre kifejtett hatását eddig még nem vizsgálták, ezért a szülést követő hangulati változás mérésére a széles körben elterjedt kényszeres úszás tesztet alkalmaztuk. A teszt 6 perces időintervalluma alatt a vízbe helyezett állatok aktív (küzdés, úszás) és passzív (lebegés) viselkedését mértük. A szülést követő 8. napon vizsgált egér anyák szignifikánsan több időt töltöttek aktív viselkedéssel, mint a kontroll nőtények, továbbá a laktáló anyák aktív viselkedéssel töltött ideje szignifikánsan több volt, mint az, amit passzív viselkedésformával töltöttek. A szenzitizált nőtények aktív és passzív viselkedéssel töltött ideje szignifikánsan nem különbözött egymástól. Továbbá a szenzitizált nőtények és laktáló anyaállatok között bármely (aktív, passzív) viselkedési formát tekintve szignifikáns különbség volt kimutatható. Ezzel ellentétben a szenzitizált nőtények viselkedési mintázata a kontroll nőtényekéhez volt hasonló. Az ovariectomizált állatok a passzív viselkedéshez képest csökkent aktív viselkedést mutattak, ugyanakkor az ovariectomizált állatok esetén tapasztalt szignifikáns változás nem jelentett szignifikáns eltérést a kontroll, illetve a szenzitizált nőtényekkel összehasonlítva.

Szenzitizált és anya egerekben elsőként mutattunk ki kondicionált helypreferencia teszt során kölyök-asszociált dobozhoz való preferenciát, továbbá laktáló egér anyákon a kényszeres úszás teszt révén bizonyítottuk az anyaság anti-depresszív hatását. A két viselkedési teszt eredményeként összességében elmondhatjuk, hogy az anyai motivációban és anyai viselkedésben bekövetkező növekedés elkülönül a folyamatos depresszió-szerű viselkedésektől szenzitizált egerek esetén, amely azt feltételezi, hogy a szenzitizációs folyamat a nőtény egerek emocionalitását az egér anyákétól eltérő módon változtatja meg.

## **6. Az egér anyák és a szenzitizált nőtény egerek amylin gén hiányában bekövetkező megváltozott viselkedése**

Transzgén egérvonalak tanulmányozásával az anyai kötődés, az anyai viselkedés és az anyákra jellemző megnövekedett alkalmazkodó képesség génszintű vizsgálatára nyílt lehetőség. Mivel az amylin anyai viselkedésben betöltött szerepét vizsgálataink során több aspektusból is bizonyítottuk, ezért dolgozatomban előző pontjában validált két, az anyai magatartást mérő tesztet amylin gén hiányában is elvégeztük.

Az anyai motivációt mérő kondicionált helypreferencia elvégzése során a reprodukzív státusz (nullipara nőstény vs. laktáló anya), valamint a genotípus között nem találtunk különbséget: a még nem szült és kölykökkel kapcsolatba nem került nőstények a számukra ismerős, de számukra kölykök jelenlétéhez nem kötött ún. kölyök-asszociált dobozban ugyanannyit tartózkodtak, mint az amylin KO kontroll nőstények, ami egyik állatcsoport esetén sem érte el a teljes kísérleti idő felét, tehát ezek az állatok ezt a térfelet nem preferálták. Ugyanakkor laktáló egér anyák a kísérleti idő egy jelentős részét abban a kölyök-asszociált dobozban töltötték, ahol a tesztet megelőző habituáció során a kölykökkel együtt voltak. Az egér anyáknál megfigyelt kölyök-asszociált doboz iránti helypreferencia amylin gén hiányában sem sérült, ugyanakkor az amylin KO anyák – vad típusú laktáló anya egerekhez hasonlóan – az ugyanazon genotípussal, de más reprodukciós fázisban lévő amylin KO kontroll nőstényekhez képest szignifikánsan többet tartózkodtak a kölykökhöz köthető kompartmentumban.

Az amylin hiányában esetlegesen bekövetkező, postpartum időszakra jellemző emocionális változás vizsgálatára kényszeres úszás tesztet végeztünk. Előző kísérletsorozatunkban megállapítottuk, hogy az anyákban speciálisan végbemenő változások szükségesek az antidepresszív tünetek megjelenéséhez, mely emocionális változás a tesztben mért fokozott aktivitásban nyilvánul meg. A szenzitizálás révén anyai viselkedést mutató nullipara egerek a kontroll, azaz nem szenzitizált nőstényekhez hasonló módon viselkedtek: idejük jelentős részét passzív viselkedéssel töltötték, tehát depresszív tüneteket mutattak. A kontroll, illetve szenzitizált és laktáló anya patkányok közötti különbség szignifikáns volt. Amylin gén hiányában a kontroll nőstények vad típusú, tehát amylint expresszáló társaikhoz hasonló módon viselkedtek, depresszió-szerű tüneteket mutattak. Az amylin gén hiánya a szenzitizált állatok FST-ben mért passzivitására sem hatott. Ugyanakkor laktáló egér anyák amylin gén hiányában, vad típusú társaiktól eltérően, az FST tesztben csökkent aktivitást, azaz depresszió-szerű tüneteket mutatnak.

A postpartum időszakban megjelenő amylin részt vehet az anyákban zajló emocionális és endokrin változások szabályozásában. Az amylin és az anyai viselkedés általa szabályozott aspektusainak ismerete újfajta terápiás irányt is jelenthet az anyasághoz társuló diszfunkciók, főként a posztnatális depresszió kezelésében.

## V. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az amylin expresszió jelentős mértékű emelkedését mutattuk ki a szülést követően patkány és egér anyák preopticus területén. Míg a szülést megelőzően amylin mRNS-t expresszáló sejtek nem voltak jelen, az expresszió mértéke a szülést követő 9. napra jelentősen megemelkedett. A preopticus területen belül csak az MPN, az MPA, valamint a BNSTv területén következett be az amylin indukciója, majd a szülést követően ugyanezen területeken az amylin peptid is kimutatható volt.

2. Az amylin megnövekedett indukciója szintén megfigyelhető volt anyai viselkedésre szenzitizált, de nem laktáló, nullipara nőstény patkányok esetén, ugyanakkor éheztetés, valamint ovariectomiát követően amylin indukció nem következett be, így az amylin megjelenése feltételezhetően a táplálékfelvételtől, valamint a petefészekhormonok jelenlététől független, ugyanakkor kölykök jelenlétéhez kötött folyamat.

3. Kölyköktől való szeparáció hatására a preopticus terület Fos-aktivitása lecsökken, majd ismételt kölyökexpozíció hatására a területen nagymértékű neuronális aktiváció következik be. Az itt jelen lévő amylin neuronok jelentős része kölykök visszaadásának hatására c-fos, azaz anyai aktivációt mutattak.

4. Az amylin TIP39-PTH2R neuromodulátor rendszerrel való kapcsolatát egyrészt az amylin neuronok és a TIP39-rostok terminálisainak területen belüli közelsége, másrészt az amylin mRNS-t expresszáló, valamint amylin immunreaktivitást mutató neuronok és a PTH2R-ir idegsejtek hasonló eloszlása, továbbá PTH2R hiányában az amylin csökkent mRNS szintje feltételezi.

5. Kondicionált helypreferencia teszt alkalmazásával kimutattuk a postpartum időszakban anya egerek és anyai viselkedésre szenzitizált nullipara nőstények esetén az anyai motiváció fokozódását. A rágsálók depresszió-szerű viselkedésének leírására leggyakrabban használt kényszeres úszás teszt során az egér anyák antidepresszív tüneteket mutattak, ugyanakkor a depresszió-szerű viselkedés csökkenése nem volt kimutatható a szenzitizált és a kontroll szűz nőstényeknél.

6. Az amylin preopticus területhez kötődő megjelenése a kondicionált helypreferencia tesztben mérhető anyai motiváció mértékére nincs hatással, ugyanakkor amylin gén hiányában az anyák a kontroll és szenzitizált állatokhoz hasonlóan a kényszeres úszás tesztben depresszió-szerű tüneteket mutatnak.

## VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

1. **Szabó ER**, Cservenák M, Dobolyi A. (2012) Amylin is a novel neuropeptide with potential maternal functions in the rat. FASEB J, 26: 272-281. **IF: 5,704**
2. **Szabó ER**, Cservenák M, Lutz TA, Gévai L, Endrényi M, Simon L, Dobolyi A. (2015) Behavioural changes in mothers and maternally sensitized female mice. BEHAVIOUR, Accepted **IF: 1,230**

### 2. Az értekezés témájában készített idézhető absztraktok

1. **Szabó ER**, Cservenák M, Dobolyi A (2012) Amylin is a novel neuropeptide activated in the brain of mother rats. IBRO International Workshop 2012, Szeged. Clinical Neuroscience 2012, Volume 65, Supplement 2: P31.
2. **Szabó ER**, Cservenák M, Dobolyi Á (2012) Identification of amylin as a novel neuropeptide activated in the brain of mother rats. Joint Meeting of the Hungarian Biophysical Society, Hungarian Physiological Society, Hungarian Society of Anatomists and Hungarian Society of Microcirculation & Vascular Biology, Debrecen. Acta Physiologica 2012, Volume 205, Supplement 690: P43.
3. **Szabó ER**, Cservenák M, Domokos D, Dobolyi Á (2012) Identification of amylin as a novel neuropeptide activated in the brain of mother rats. XXI. International Semmelweis Symposium, Budapest. Orvoscépzés 2012, Volume 87: 327.
4. Dobolyi A, Cservenak M, Lutz T, Usdin TB, **Szabo ER** (2014) Amylin, induced by suckling in the preoptic area of mothers, may be involved in the control of maternal motivation. 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan, Italy. Abstract Number: FENS-1828.
5. **Szabó ER**, Cservenak M, Udvari E, Dobolyi Á (2014) Induction of amylin in the preoptic area of lactating dams depends on TIP39-containing posterior thalamic neurons. Meeting of

the Federation of European Physiological Societies (FEPS), Meeting Abstract: P10.10. Acta Physiologica 2014, Volume 211 Supplement 697: 144-145.

6. **Szabó ÉR**, Cservenák M, Lutz TA, Gévai L, Endrényi M, László Simon L, Dobolyi Á (2015) Behavioral changes in mother and maternally sensitized female mice. XV. Biannual Conference of the Hungarian Neuroscience Society (MITT), Budapest, Hungary, Abstract Number: P1/93

7. **Szabó ÉR**, Cservenák M, Udvari E, Dobolyi Á (2015) Induction of amylin in the preoptic area of lactating dams depends on TIP39-containing posterior thalamic neurons. Magyar Anatómus Társaság XIX. Kongresszusa, Szeged, Hungary, Abstract Number: P50.

### **3. Egyéb, az értekezéshez fel nem használt publikációk**

1. Vincze C, Pál G, Wappler EA, **Szabó ER**, Nagy ZG, Lovas G, Dobolyi A. (2010) Distribution of mRNAs encoding transforming growth factors-beta1, -2, and -3 in the intact rat brain and after experimentally induced focal ischemia. J Comp Neurol. 18: 3752-70. **IF: 3,774**

2. Cservenák M, **Szabó ÉR**, Bodnár I, Lékó A, Palkovits M, Nagy GM, Usdin TB, Dobolyi A. (2013) Thalamic neuropeptide mediating the effects of nursing on lactation and maternal motivation. Psychoneuroendocrino, 12: 3070-84. **IF: 5,591**

3. Helfferich F, Lourmet G, Szabó ÉR, Boldogkői Zs, Palkovits M. (2016) Facial virus inoculations infect vestibular and auditory neurons in rats. Clin Neurosci, 69: E001-E004. **IF: 0,386**



## VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Dobolyi Árpádnak, akinek mindenkor támogatása, biztatása és tanácsai nélkül nem jöhetett volna létre ezen dolgozat. Köszönöm türelmét és azt, hogy bármikor fordulhattam hozzá segítségért. Külön köszönet illeti Prof. Palkovits Miklós tanár urat, első főnökömet, akinek kitartása, precizitása, valamint az idegtudomány és a kutatómunka iránti szeretete a mai napig számomra példamutató értékű. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Alpár Alán docens úrnak, hogy disszertációm házi bírálatát elvállalta, melyet rendkívüli precizitással, segítő szándékkal és építő jellegű, jóindulatú kritikával végzett el.

Külön köszönet illeti Dr. Gerber Gábor, a SE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet általános igazgatóhelyettesét, aki lehetővé tette, hogy egy tanév erejéig a kutatómunkára koncentrálhassak.

Szeretném megköszönni a Neuromorfológiai Laboratórium lelkes csapatának a segítséget, támogatást és a munkával töltött jókedvű hétköznapiakat. Dr. Vitéz-Cservenák Melindát, Dr. Dobolyiné dr. Renner Évát, és Dr. Pál Gabriellát a szakmai, Hanák Nikolettet, Deák Szilviát és Dellaszéga-Lábas Viktóriát a technikai, Toronyay-Kasztner Magdolnát az ügyintézői segítségéért illeti külön köszönet. Köszönöm mindannyiuknak, hogy nem csak munkatársaim, hanem barátaim is voltak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretné megköszönni Férjem, Szüleim és Testvéreim segítségét, akik szerető támogatására mindig számíthattam.